

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA

“San Vicente Mártir”

**ESTUDIO SOBRE BIOMARCADORES MOLECULARES PARA EL
DIAGNÓSTICO Y EL SEGUIMIENTO DE ELA**

**TRABAJO FIN DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
“GRADO EN ENFERMERÍA”**

Presentado por:

D^a CLAUDIA FORNÉS PÉREZ

Tutor/a:

Dra. D^a MARIA BENLLOCH GARCÍA

Valencia, a 6 de mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mis padres por estar incondicionalmente a mi lado, por haberme educado y por confiar siempre en mí. Gracias por vuestra paciencia y apoyo en todo momento. Por último, gracias por haber trabajado tan duro para brindarme el sueño de estudiar enfermería. Nunca os lo podré agradecer lo suficiente.

Con especial cariño, también quiero dar las gracias a la persona que me ha guiado durante estos meses en la realización de mi trabajo fin de grado, a mi tutora María Benlloch García. Sin ti, este trabajo no hubiese sido posible.

Han sido 4 años de mucho esfuerzo y trabajo constante pero aun así ha sido la mejor etapa de mi vida. Gracias a toda la gente que ha formado parte de ella.

Durante estos años he aprendido a ser más empática, más paciente y valorar lo realmente importante en la vida.

Estar al principio y al final de muchas vidas puede ser difícil pero la vocación en el trabajo hace que des lo mejor de ti en todo momento y eso, para mí, es el fundamento de la enfermería.

Por último, pero no más importante, quiero darle gracias a mis pacientes, porque sin ellos no podría haber llegado hasta aquí.

RESUMEN

Introducción: La esclerosis lateral amiotrófica o ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una degradación gradual de la función de las motoneuronas provocando una parálisis muscular progresiva. Actualmente, el diagnóstico de ELA suele ser tardío ya que no hay pruebas diagnósticas específicas ni tampoco hay un tratamiento efectivo, considerándose así, una enfermedad neurodegenerativa letal con una supervivencia limitada. Por ello, se necesitan estudios que ayuden a la aportación de biomarcadores para el diagnóstico y el seguimiento de ELA con tratamientos experimentales e incluso curativos.

Objetivos: Revisión de la literatura científica actual acerca de los biomarcadores moleculares de fácil medición en ELA para el diagnóstico precoz y seguimiento de la enfermedad, en modelo humano.

Metodología: Revisión bibliográfica basada en la búsqueda en diferentes bases de datos principales (PubMed, EBSCO, CUIDEN y SciELO).

Resultados: Los resultados obtenidos tras el análisis bibliográfico han sido muy positivos llegándose a demostrar diversos biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento tanto de ELA esporádico como familiar. Toda la evidencia mostrada tras el análisis realizado muestra que los marcadores seleccionados poseen una alta sensibilidad y especificidad para la consecución de nuestro propósito.

Conclusiones: Determinadas moléculas han sido verificadas como marcadores por su potencial uso en un perfil de biomarcadores característico de ELA.

Palabras claves: 'Esclerosis Amiotrófica Lateral', 'biomarcadores', 'plasma', 'microRNA'.

ABSTRACT

Introduction: Amyotrophic Lateral Sclerosis or ALS is a neurodegenerative disease characterized by a gradual degradation of motor neuron function causing progressive muscular paralysis. At present, the diagnosis of ALS is usually delayed due to there are no specific diagnostic tests nor is there an effective treatment, considering a deadly neurodegenerative disease with limited survival. Therefore, studies are needed to help the contribution of biomarkers for the diagnosis and the follow-up of ALS with experimental and even curative treatments.

Objective: Review of the current scientific literature about the molecular biomarkers of easy measurement in ALS for the early diagnostic and follow-up of the disease, in human model.

Methodology: Bibliographic review based on the search in the different main databased (PubMed, EBSCO, CUIDEN and SciELO).

Results: The results obtained after the bibliographic analysis have been so positive and several biomarkers have been demonstrated for the early diagnosis and follow-up of both sporadic and familial ALS. All the evidence shown after the selected markers have a high sensivity and specificity for the achievement of our purpose.

Conclusions: Certain molecules have been verified as markers for their potential use in a profile of biomarkers characteristic of ALS.

Key words: 'Amyotrophic Lateral Sclerosis', 'biomarkers', 'plasma', 'microRNA'.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. Generalidades y definición de ELA | 3 |
| 2. Bioquímica de la enfermedad..... | 4 |
| 2.1. Excitotoxicidad..... | 5 |
| 2.2. Estrés oxidativo..... | 5 |
| 2.3. Disfunción mitocondrial..... | 7 |
| 2.4. Agregados proteicos o agregados intracelulares | 8 |
| 2.5. Neuroinflamación | 8 |
| OBJETIVOS..... | 10 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 11 |
| 1. Metodología aplicada a la investigación | 11 |
| 2. Procedimiento y tratamiento de la bibliografía..... | 11 |
| 3. Criterios de inclusión y exclusión..... | 11 |
| 4. Diagrama de flujo..... | 15 |
| RESULTADOS/ DISCUSIÓN | 16 |
| 1. Biomarcadores de estrés oxidativo | 16 |
| 2. Biomarcadores metabólicos | 20 |
| 3. Cistatina C como biomarcador..... | 22 |
| 4. TDP-43 como biomarcador | 23 |
| 5. Otros biomarcadores | 24 |
| CONCLUSIONES | 29 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 30 |

ÍNDICE DE TABLAS I FIGURAS

Introducción

| | |
|--|---|
| Figura 1: Procesos celulares y moleculares que median la neurodegeneración en ELA.... | 4 |
| Figura 2: Formación de los radicales libres..... | 6 |
| Figura 3: Daño mitocondrial en ELA..... | 7 |

Material y métodos

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Búsqueda en PubMed y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente..... | 12 |
| Tabla 2: Búsqueda en EBSCO y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente..... | 13 |
| Tabla 3: Búsqueda en CUIDEN y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente..... | 13 |
| Tabla 4: Búsqueda en SciELO y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente..... | 14 |

Resultados/Discusión

| | |
|---|----|
| Tabla 5: Artículos científicos donde se han estudiado biomarcadores de estrés oxidativo en ELA | 17 |
| Tabla 6: Artículos científicos donde se ha estudiado la metabolómica como biomarcador en ELA | 20 |
| Tabla 7: Artículos científicos donde se han estudiado el potencial uso de la cistatina C como biomarcador en ELA | 22 |
| Tabla 8: Artículos científicos donde se han estudiado la posibilidad de TDP-43 como biomarcador en ELA | 23 |
| Tabla 9: Artículos científicos donde se han estudiado posibles biomarcadores en ELA. | 25 |

| ACRÓNIMOS | DEFINICIÓN |
|-------------------------------|---|
| %CoQ10 | Porcentaje de CoQ10 |
| %PUFA | Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados |
| 24 OH-C | 24 hidroxicolesterilo |
| AOPP | Proteínas de oxidación avanzada |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| C9orf72 | Cromosoma 9 marco de lectura abierto 72 |
| CAT | Catalasa |
| CC-16 | Proteína de las células clara |
| ChT | Quitotriosidasa |
| CK | Creatina quinasa |
| CoQ ₁₀ | Coenzima Q10 |
| CTX | Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EAAT2 | Transportador excitatorio de aminoácidos 2 |
| ELA | Esclerosis lateral amiotrófica |
| FRAP | Capacidad reductora de hierro en plasma |
| FUS | Proteína vinculante al RNA |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| IL- 10 | Interleucina- 10 |
| IL- 12 | Interleucina- 12 |
| IL- 13 | Interleucina- 13 |
| IL- 1β | Interleucina- 1 beta |
| IL- 6 | Interleucina- 6 |
| IL- 8 | Interleucina- 8 |
| LCAT | Enzima lecitín-colesterol acil transferasa |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LMN | Neuronas motoras inferiores |

| | |
|-----------------------------|--|
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| MCP-1 | Proteína quimioatrayente de monocitos 1 |
| MDA | Malondialdehído |
| mSOD1 | SOD 1 mitocondrial |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| mtRNA | RNA mitocondrial |
| NAA | Ácido N-acetil aspártico |
| NADPH | Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintetasa |
| NOX-2 | NADPH oxidasa 2 |
| O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| OH ⁻ | Radical hidroxilo |
| PCR | Proteína C reactiva |
| PINP | Propéptido N-terminal del protocógeno tipo I |
| pNFH | Cadena pesada de neurofilamento fosforilado |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNS | Especies reactivas del nitrógeno |
| ROS | Especies de oxígeno reactivo |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SOD | Superóxido dimutasa |
| SOD1 | Superóxido dimutasa 1 |
| TDP-43 | Proteína vinculante al DNA |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral alfa |
| UMN | Neuronas motoras superiores |
| VEGF | Factor de crecimiento vascular endotelial |

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades y definición de ELA.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como la enfermedad de Lou Gehrig, es una de las principales enfermedades neurodegenerativas del adulto caracterizada por una progresiva degradación tanto de las neuronas motoras superiores (UMN) de la corteza motora primaria como de las neuronas motoras inferiores (LMN) del tronco cerebral y la médula espinal¹.

El pronóstico de vida de estos pacientes es de unos 3-5 años desde la aparición de los síntomas pero un pequeño porcentaje sobrevive aproximadamente unos 10 años^{2,3}.

Esta enfermedad es caracterizada por la debilidad, atrofia muscular, fasciculaciones musculares, calambres y espasticidad muscular con dificultad para hablar (disartria), disfagia e incluso dificultad respiratoria, la cual llega a ser, en muchos casos, la causa de muerte²⁻⁵.

Al ser una enfermedad incurable, el tratamiento se basa en proporcionar información sobre nutrición, terapia respiratoria e ayuda psicológica³. Sin embargo, en muchos casos se administra Riluzol, un antagonista del glutamato que desacelera la progresión de la enfermedad^{1,2}.

Se pueden distinguir dos variantes de ELA: ELA esporádica responsable del 90-95% de los casos y ELA familiar causante del 5-10% de los casos¹.

La ELA esporádica tiene etiología desconocida aunque se cree que puede deberse a factores ambientales, toxinas o alteraciones genéticas^{1,4}.

En ELA familiar la causa es genética y hay evidencias de estar causado por mutaciones en diversos genes^{1,3,4} de los que se obtendrían proteínas tales como:

La superóxido dimutasa 1 (SOD1): es la isoenzima encargada de la catalización en el organismo de radicales libres de óxido (ROS) a moléculas de O₂ y H₂O₂ (ver apartado 2.2). La mutación de esta isoenzima, responsable del 20% de los casos de ELA familiar, produce toxicidad celular con lo que se manifiesta en disfunción mitocondrial (véase punto 2.3.), interrupción del impulso nervioso axonal y formación de inclusiones con capacidad de agregación debido a la inestabilidad de la proteína proteica^{1,4}.

La proteína vinculante al DNA-43 (TDP-43) es una proteína priónica implicada en la regulación del esplicing de muchos genes y de la estabilidad de los mRNA por lo que su mutación es responsable del 5% de los casos de ELA familiar^{1,3,4}.

FUS es una proteína implicada en la regulación del RNA y en el procesamiento de determinadas funciones. Las mutaciones tanto en FUS como en TDP-43 propician la agregación proteica provocando daño neuronal con pérdida de la funcionalidad²⁻⁴.

Proteína “*chromosome 9 open reading frame 72*” (derivada del gen *c9orf72*, es responsable del 30% de los casos de ELA familiar): se encuentra muy extendida en el

cerebro, en el citoplasma de neuronas y en terminaciones presinápticas, por lo que su mutación puede causar alteraciones en el metabolismo y procesamiento del RNA^{2,4}.

El diagnóstico de ELA suele ser tardío y por tanto, se necesitan estudios que ayuden a la aportación de biomarcadores para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Sin embargo, actualmente, el diagnóstico de ELA se basa en la historia clínica del paciente junto con pruebas complementarias como pruebas de neuroimagen y análisis del plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR)^{2,4,6}.

Para introducirnos en el estudio de biomarcadores, es necesario que conozcamos la patogenia de ELA desde el punto de vista molecular.

2. Bioquímica de la enfermedad

Las motoneuronas (ver Figura 1) presentan una vulnerabilidad selectiva a procesos patogénicos como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, los agregados proteicos y la neuroinflamación⁶⁻¹⁰.

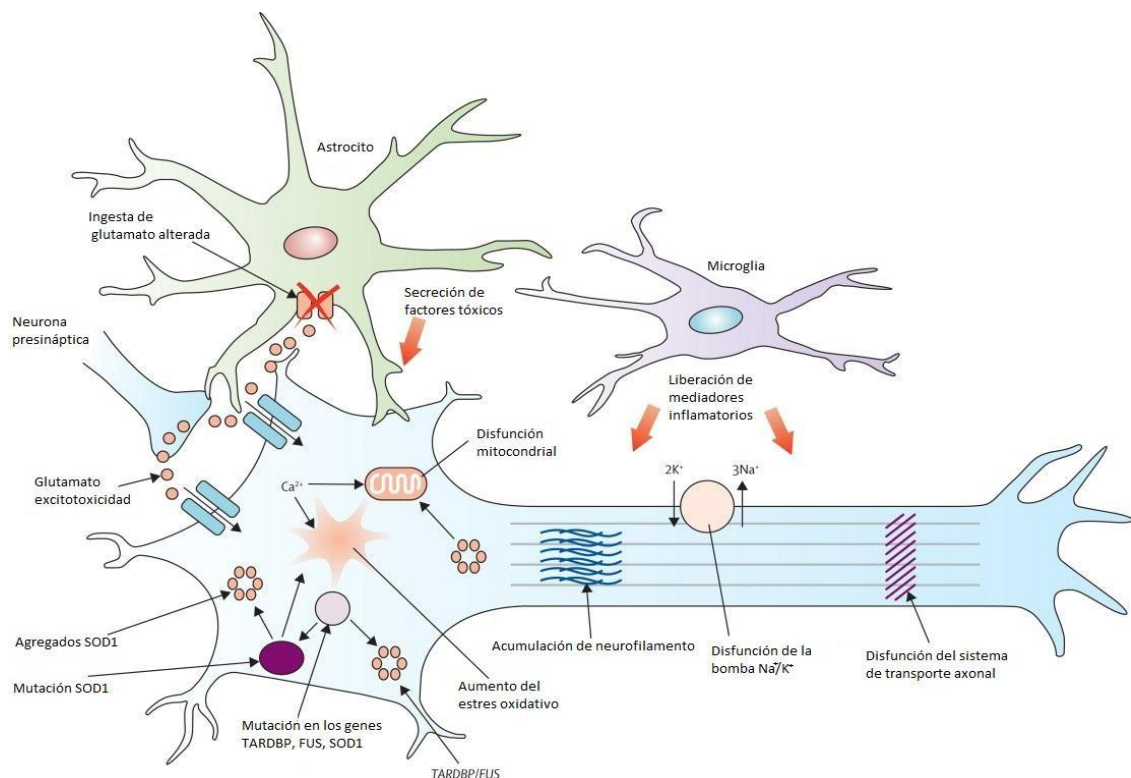


Figura 1: Procesos celulares y moleculares que median la neurodegeneración en ELA. Extraído y modificado de Kiernan et al.³.

2.1. Excitotoxicidad

Uno de los neurotransmisores implicados en la transmisión de los impulsos nerviosos en el sistema nervioso central (SNC) es el glutamato⁷. En ELA la excitotoxicidad motoneuronal es causada por la alteración producida en el sistema glutaminérgico (por la alteración del equilibrio del calcio intracelular y la producción de radicales libres)⁹.

En el sistema glutaminérgico, el transportador excitatorio de aminoácidos tipo 2 (EAAT2) es el transportador específico encargado de liberar el glutamato en el espacio sináptico^{3,9}.

En ELA hay un fallo en la recaptación de glutamato en la motoneurona por lo que este aminoácido permanece en el espacio sináptico produciendo una sobreestimulación sobre los receptores de membrana del glutamato. Todo ello conlleva daño en los orgánulos neuronales e incluso muerte neuronal y apoptosis⁷.

Además, la presencia de especies de oxígeno reactivo (ROS) y de nitrógeno (RNS) (véase punto 1.2.2) incrementa el daño producido en este proceso excitotóxico^{3,11}.

2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una de las principales causas de degeneración neuronal debido a la alteración del equilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres ROS y RNS^{7,8}.

Se define el término radical libre como una entidad molecular que contiene electrones desapareados en un orbital atómico por lo que tiene gran nivel de reactividad para el organismo^{12,13}.

En condiciones normales entre un 1-5% del oxígeno (O_2) se convierte en ROS debido a la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, produciendo principalmente el radical anión superóxido (O_2^-). Por ello, durante el proceso de respiración celular los electrones convierten O_2 en O_2^- y posteriormente, en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\cdot). Por otra parte, la sintasa de óxido nítrico (NOS) sintetiza el óxido nítrico (NO), un radical reactivo con capacidad oxidativa (ver Figura 2)^{10,12,14,15}.

Como consecuencia de este proceso habrá una cantidad excesiva de radicales libres en la célula provocando alteraciones en la estructura de las proteínas, en los lípidos, en el DNA, etc.^{6,7,10,15}.

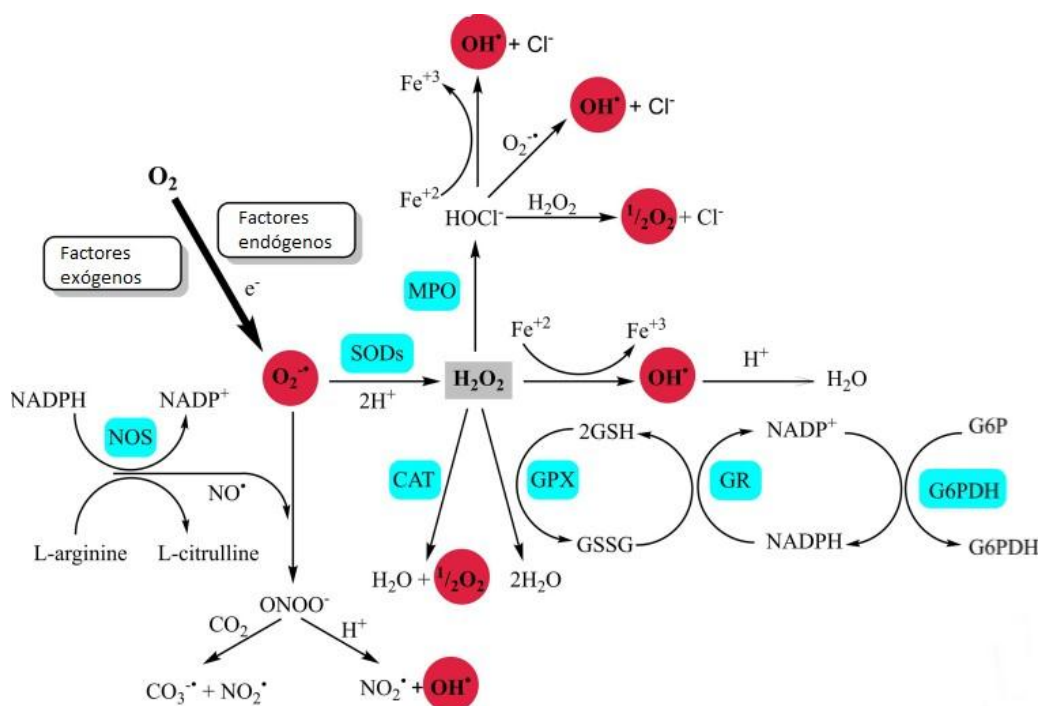


Figura 2: Formación de los radicales libres. Extraído y modificado de Niedzielska, et al.¹⁰.

Para disminuir el impacto del estrés oxidativo en el organismo, el propio cuerpo lleva inherente un sistema de defensa¹⁰. Este sistema está formado por antioxidantes cuya función consiste en contrarrestar los efectos de ROS/RNS para prevenir el daño de los tejidos celulares^{10,13}.

Estas moléculas antioxidantes se clasifican en *endógenas* y *exógenas*. También se clasifican en *componentes enzimáticos* como la superóxido dimutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa y *componentes no enzimáticos* como el glutatión, la coenzima Q₁₀, las vitaminas A, C y E, el selenio y el zinc y los compuestos fenólicos¹⁶.

Los antioxidantes enzimáticos (todos ellos endógenos), tienen capacidad protectora frente al daño oxidativo¹³; entre ellos se encuentran:

Las catalasas (CAT), para catalizar la reducción del H_2O_2 en O_2 y H_2O ¹³. Trabaja junto con otra enzima antioxidante importante, la *SOD* (explicada anteriormente).

La glutatión peroxidasa (GPx), utilizada para la reducción del H_2O_2 en alcoholes junto con el glutatión (GSH). Además, también se utiliza como mediadora en algunas enfermedades para regular la concentración de H_2O_2 ¹³.

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser endógenos o aportados por la dieta^{10,13}.

A este grupo pertenecen:

El glutatión (GSH), un tripéptido considerado como uno de los mayores antioxidantes utilizados para la eliminación de ROS a nivel celular^{7,8,13}.

Y los antioxidantes exógenos: *vitamina A* (aunque puede ser formada en el hígado)¹³, *vitamina C* (o ácido ascórbico)^{11,13}, *vitamina E* (es el antioxidante natural más importante en la reducción de ROS/RNS, además, hay indicios de que la presencia de una concentración correcta de vitamina E ayuda a desacelerar el avance de la enfermedad)^{7,13}, *selenio y zinc* (son los minerales de mayor potencial antioxidante y se encargan del mantenimiento de la actividad enzimática. El zinc es un inhibidor de NADPH y se encarga de la conversión del O_2 en H_2O_2)¹³ y los *polifenoles* (tienen capacidad antioxidante gracias a su disposición estructural y forman parte de los vegetales). Su importancia viene dada por la capacidad antagonista y eliminadora de ROS y RNS¹³.

2.3. Disfunción mitocondrial

Diversos estudios han demostrado que en ELA hay un daño en la morfología mitocondrial y, por tanto, de las funciones que éste realiza, considerándose así como un factor contribuyente a la evolución de las enfermedades neurodegenerativas^{7,9}.

Como consecuencia de esta disfunción mitocondrial se manifiestan múltiples alteraciones como la interrupción de la respiración celular por lo que hay una privación de energía en forma de ATP, aumento de ROS/RNS causando mayor daño mitocondrial, falta de equilibrio en las concentraciones de calcio intracelular por la excitotoxicidad causada en el sistema glutaminérgico y daño en el mtDNA y por tanto, del mtRNA, provocando mutaciones en la síntesis proteica y disminución de la concentración de antioxidantes celulares^{5,7,9,15}.

Como etiología del daño mitocondrial (ver Figura 3) se encuentra el propio proceso neurodegenerativo y la presencia de algunas mutaciones proteicas como SOD1 mitocondrial (mSOD1) la cual provoca que la concentración de superóxido aumente^{5,6,9}.

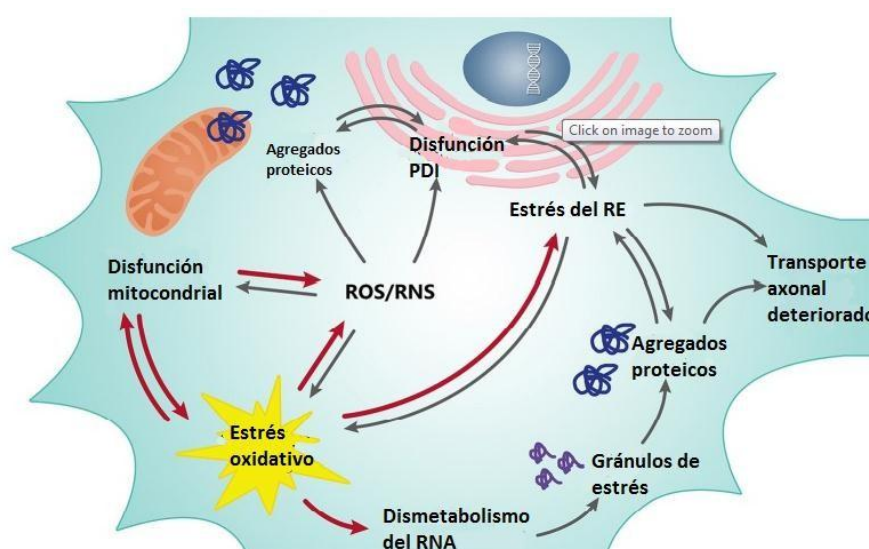


Figura 3: Daño mitocondrial en ELA. Extraído y modificado de Carri et al.⁸.

2.4. Agregados proteicos o agregados intracelulares

Algo muy común en las enfermedades neurodegenerativas es la presencia de agregados proteicos intracelulares que provocan toxicidad neuronal^{5,7,9}.

La etiología de este proceso radica en la presencia de diversas anormalidades proteicas como: la *SOD1*, por la disociación de los dímeros en monómeros con lo que hay mayor agregación proteica disminuyendo así la función enzimática además de provocar inclusiones citoplasmáticas en los astrocitos, las inclusiones ubiquitinadas de la *TDP-43* y la presencia de *FUS*^{7,9,10}.

Cabe señalar que la presencia celular de estrés oxidativo potencia aún más la toxicidad neuronal provocada por la agregación de proteínas^{7,10}.

Esta degradación motoneuronal mediada por los agregados intracelulares y el estrés oxidativo puede causar la disminución de la actividad de las chaperonas (ayudan en el plegamiento de proteínas recién creadas por los ribosomas), además de alterar el proceso de ubiquitinación (la ubiquitina “marca” a las proteínas que deben ser degradadas)⁵.

2.5. Neuroinflamación

La activación de la microglía y los astrocitos, la infiltración de linfocitos T y la producción de citoquinas inflamatorias forman parte del proceso de pérdida de función neuronal cerebral, proceso llamado neuroinflamación^{9,14,17,18}.

Además, diversos estudios han encontrado alteraciones en múltiples péptidos inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-13 (IL-13) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)⁶.

Las microglías son células que forman parte de la inmunidad innata del SNC. Asimismo, inspeccionan el medio celular y responden a las señales producidas por los tejidos dañados^{14,17,18}. Cada una de estas señales son detectadas rápidamente por la microglía produciendo una alteración en la homeostasis cerebral por lo que hay un cambio en la morfología liberando citoquinas para paliar el daño tisular producido¹⁷.

Microgliosis (proliferación de microglías) y astrogliosis (proliferación de astrocitos) son procesos neuroinflamatorios característicos en ELA¹⁸.

La activación de la microglía se debe a un error en el plegamiento de las proteínas como la mSOD1 liberándose moléculas citotóxicas como ROS, NO, proteasas y citoquinas inflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina-6 (IL-6)^{9, 14}.

Los astrocitos forman parte del mantenimiento de las neuronas del SNC y de las concentraciones de glutamato extracelular¹⁴. En ELA, con la pérdida de transportadores de glutamato EAAT2, se produce un exceso en la concentración de glutamato en el

espacio sináptico y los astrocitos no pueden equilibrar estas concentraciones, produciendo toxicidad en las motoneuronas¹⁴.

Durante este proceso, los astrocitos liberan sustancias inflamatorias como prostaglandinas E2, leucotrieno B4 (LTB4), NO y NADPH oxidasa 2 (NOX-2). Además, los astrocitos pueden activar las caspasas, proteínas marcadoras de muerte celular¹⁴.

Son muchos los estudios que en los últimos 5 años han investigado marcadores de la enfermedad de ELA. Ello se debe a que los avances sobre la fisiopatología molecular de la enfermedad se van conociendo paulatinamente, como se ha indicado previamente.

Pero es necesario conocer qué marcadores son los más efectivos a la hora del diagnóstico así como en el seguimiento de la enfermedad. Sobre todo en el caso de un tratamiento experimental, donde podamos seguir la progresión de la enfermedad y su evolución (ver si el tratamiento está siendo beneficioso) a nivel molecular (a parte de la valoración de la mejora motora). Ésta es, por ello, la finalidad del presente trabajo.

OBJETIVOS

Tras analizar los puntos desarrollados en la introducción y determinar la necesidad de conocer los biomarcadores moleculares más efectivos de la enfermedad de ELA, se desarrollaron los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Revisión de la literatura actual específica referente a los biomarcadores moleculares estudiados para ELA.

Objetivos específicos

- Indicar qué biomarcadores son los más estudiados y de fácil análisis.
- Indicar los biomarcadores apropiados para ELA esporádico.
- Indicar qué biomarcadores son los más adecuados en el diagnóstico y seguimiento de ELA familiar.
- Perspectivas para utilizar dichos biomarcadores en el futuro estudio de tratamiento de ELA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología aplicada a la investigación

El trabajo consta de una revisión narrativa basada en la búsqueda documental de artículos científicos seleccionados. Dicha búsqueda se ha centrado en las generalidades de ELA y la presencia de marcadores biomoleculares de la enfermedad. Para ello, se utilizaron una serie de criterios de inclusión y exclusión mostrados a continuación.

2. Procedimiento y tratamiento de la bibliografía

Para realizar la búsqueda de artículos se consultaron las bases de datos siguientes: PubMed (MedLine), EBSCO, Cuiden y SciELO.

La terminología empleada en la búsqueda se basó en diversos términos clave correspondientes al tema a tratar. Por ello, los tesauros empleados y extraídos desde la plataforma MeSH han sido: 'Amyotrophic Lateral Sclerosis', 'biomarkers', 'plasma' y 'microRNA'.

Por otra parte, para realizar la búsqueda estratégica de artículos en castellano, se consultó la base de datos DeCS donde se utilizaron los tesauros 'Esclerosis Amiotrófica Lateral', 'biomarcadores', 'plasma' y 'microRNA'.

Se realizó una primera búsqueda estratégica utilizando los tesauros 'Amyotrophic Lateral Sclerosis' AND 'biomarkers' AND 'plasma' pero al pretender un estudio de biomarcadores moleculares de fácil medición, se realiza una segunda búsqueda más específica utilizando el tesoro "microRNA" en combinación con el operador booleano NOT (puesto que el análisis de microRNAs no sigue una técnica sencilla y en la actualidad supone un análisis complejo).

3. Criterios de inclusión y exclusión

La selección de los artículos científicos se realizó en función de diversos criterios: fueron excluidos todos aquellos trabajos que no eran estudios originales y experimentales, como podían ser las revisiones. También aquellos con una antigüedad mayor a 10 años y aquellos que se repetían en las bases de datos. Por último, se excluyeron aquellos trabajos que no describían directamente moléculas como marcadores de ELA ni la forma de obtenerlas en plasma. Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: investigaciones clínicas, realizadas por ello en humanos.

Dado que se pretende estudiar biomarcadores de fácil medición y, en la actualidad, el análisis de microRNAs sigue una metodología compleja, se añade un nuevo criterio de exclusión: microRNA para la obtención de biomarcadores de fácil medición, conforme lo descrito en el apartado anterior.

Los resultados para las diferentes búsquedas en las bases de datos se encuentran en las tablas siguientes:

Búsqueda en PubMed:

Búsqueda en PubMed con las palabras claves (o tesauros) indicadas en la Tabla 1.

| BÚSQUEDA PUBMED | TESAUROS O PALABRAS CLAVE | ARTÍCULOS ENCONTRADOS | ARTÍCULOS SELECCIONADOS |
|----------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA | 102 | 33 |
| 2 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA NOT microRNA | - | 25 |
| 3 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA | 0 | 0 |
| 4 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |

Tabla 1: Búsqueda en PubMed y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.

Búsqueda en EBSCO: En la base de datos EBSCO (ver tabla 2) se realizó la misma estrategia de búsqueda que en la base de datos PubMed.

| BÚSQUEDA EBSCO | TESAUROS O PALABRAS CLAVE | ARTÍCULOS ENCONTRADOS | ARTÍCULOS SELECCIONADOS |
|----------------|--|-----------------------|-------------------------|
| 1 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA | 46 | 10 |
| 2 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA NOT microRNA | - | 6 |
| 3 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA | 0 | 0 |
| 4 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |

Tabla 2: Búsqueda en EBSCO y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.

Búsqueda en CUIDEN: Búsqueda en la base de datos con las palabras de la Tabla 3.

| BÚSQUEDA CUIDEN | TESAUROS O PALABRAS CLAVE | ARTÍCULOS ENCONTRADOS | ARTÍCULOS SELECCIONADOS |
|-----------------|--|-----------------------|-------------------------|
| 1 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA | 0 | 0 |
| 2 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |
| 3 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA | 0 | 0 |
| 4 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |

Tabla 3: Búsqueda en CUIDEN y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.

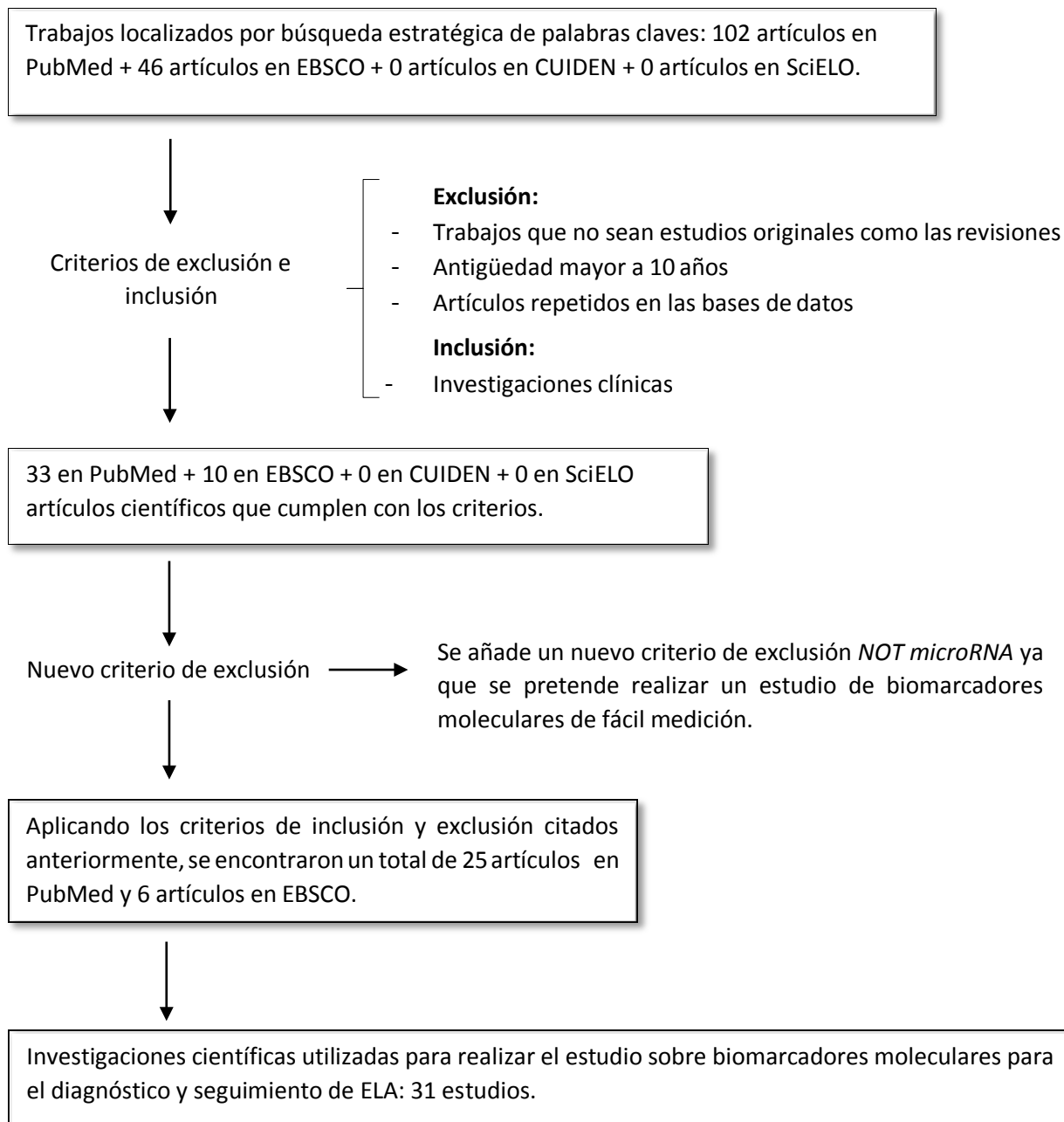
Búsqueda en SciELO: Búsqueda en la base de datos con las palabras de la Tabla 4.

| BÚSQUEDA | TESAUROS O PALABRAS CLAVE | ARTÍCULOS ENCONTRADOS | ARTÍCULOS SELECCIONADOS |
|----------|--|-----------------------|-------------------------|
| 1 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA | 0 | 0 |
| 2 | ALS AND BIOMARKERS AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |
| 3 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA | 0 | 0 |
| 4 | ESCLEROSIS AMIOTRÓFICA LATERAL AND BIOMARCADORES AND PLASMA NOT microRNA | 0 | 0 |

Tabla 4: Búsqueda en SciELO y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.

4. Diagrama de flujo

Siguiendo la normativa interna de TFG de la Facultad de Enfermería de la UCV, se especifica la búsqueda realizada también mediante un diagrama de flujo en el apartado de metodología.



RESULTADOS/ DISCUSIÓN

Los conocimientos actuales sobre los mecanismos fisiopatológicos de ELA subyacen en la excitotoxicidad glutaminérgica, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la agregación proteica y la neuroinflamación. Toda la variedad fisiológica y bioquímica producida durante estos procesos conduce a la neurotoxicidad producida en las motoneuronas.

Dado que la aparición sintomatológica ocurre tiempo después del comienzo de la neurotoxicidad, se necesitan conocer biomarcadores clínicos para mejorar la velocidad y precisión del proceso diagnóstico; más aún, tratándose de una enfermedad con un tiempo limitado de supervivencia y sin tratamiento curativo.

Tras el estudio realizado, podemos observar que verdaderamente sí que hay biomarcadores con elevada sensibilidad y especificidad, aunque su utilización diagnóstica es dificultosa debido a la diferencia en los mecanismos fisiopatológicos de cada paciente.

Durante la realización del trabajo, se han encontrado un total de 31 artículos que analizan los niveles de determinados biomarcadores en plasma y en LCR. Además, se han combinado cada uno de los resultados con los biomarcadores más utilizados.

De ellos, 26 artículos son descriptivos-observacionales mientras que 5 estudios son experimentales. Muchos de ellos longitudinales.

A continuación se describen dichos resultados según el tipo de biomarcadores estudiados en los artículos seleccionados.

1. Biomarcadores de estrés oxidativo

Con el objetivo de saber cuáles eran los biomarcadores de estrés oxidativo en ELA se encontraron un total de siete estudios que investigan este propósito (ver tabla 5).

Como se ha descrito anteriormente, el estrés oxidativo es una de las principales causas de degeneración neuronal en múltiples enfermedades neurodegenerativas (entre las que se encuentra ELA) debido a la alteración producida por sus respectivos radicales libres y la alteración en la homeostasis del sistema redox^{7,10,12}.

De ahí que se plantea el estudio sobre cuáles son los biomarcadores de estrés oxidativo de la enfermedad para conseguir tanto un tratamiento efectivo como un diagnóstico precoz.

| NOMBRE DEL ARTÍCULO | AUTOR | RESULTADOS | REF. |
|--|--|--|------|
| Increased oxidative stress in patients with ALS and the effect of edaravone administration | Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H | -Marcadores de estrés oxidativo como la 3- nitrotirosina y 8-hidroxi guanina se encontraron incrementados en los pacientes con ELA esporádico. -A mayor daño oxidativo hay un incremento significativo de %CoQ10 (porcentaje de Coenzima Q10), una disminución en los niveles de urato y una fuerte reducción en %PUFA (porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados). | 19 |
| Lack of association between nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 promoter gene polymorphisms and oxidative stress biomarkers in ALS | LoGerfo A, Chico L, Borgia L, Petrozzi L, Rocchi A, D'Amelio A, et al. | -Como biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo se han descrito los productos de proteínas de oxidación avanzada (AOPP), la capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP) y el urato (relacionado con la progresión de la enfermedad). Mientras que AOPP aumenta, FRAP y el urato disminuye. | 20 |
| Pre-diagnostic plasma urate and the risk of ALS | O'Reilly ÉJ, Bjornevik K, Schwarzschild MA, McCullough ML, Kolonel LN, Le Marchand L, et al. | -Significativa disminución de los niveles plasmáticos de urato en pacientes con ELA; por ello su potencial uso como biomarcador. | 21 |
| The role of oxidative stress in ALS and PD | Baillet A, Chantepedrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. | -La concentración plasmática del malondialdehído (MDA) es notablemente mayor que en el grupo control, mientras que la del selenio, los tioles libres y el zinc es menor. -Mientras que la actividad de la SOD1 es más baja en ELA, la de la glutatión peroxidasa (GPx) permanece en niveles normales. | 22 |
| Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of ALS | Cova E, Bongioanni P, Cereda C, Metelli MR, Salvaneschi L, Bernuzzi S, et al. | -Alteración de la actividad de diversas enzimas antioxidantes (SOD1, GPx y glutatión reductasa (GR)) comparado con el grupo control. | 23 |
| Metal concentrations in CSF and blood plasma from patients with ALS | Roos PM, Vesterberg O, Syversen T, Flaten TP, Nordberg M. | -Importante aumento en las concentraciones de Mn, Al, Cd, Co, Cu, Zn, Pb, V y U (en LCR) y Hg y Ag (en plasma) en los pacientes con ELA. | 24 |
| The level of 24-hydroxycholesteryl esters decreases in plasma of patients with PD | Di Natale C, Monaco A, Pedone C, Tessitore A, De Mase A, Tedeschi G et al. | -La enzima lecitín-colesterol acil transferasa (LCAT) como biomarcador oxidativo dada su alteración en plasma y LCR. -Uso del 24-hidroxicolesterilo como biomarcador de lesión oxidativa dada su significativa disminución en plasma en el grupo de ELA. | 25 |

Tabla 5: Artículos científicos donde se han estudiado biomarcadores de estrés oxidativo en ELA.

Fueron varios estudios los que encontraron una **disminución importante de los niveles en plasma del urato** (relacionados con la progresión de la enfermedad) por el aumento de concentración de 3-nitrotirosina. Además, se encontró un incremento en la concentración de bilirrubina no conjugada^{19,20}. Continuando con el urato (que también tiene actividad antioxidante), la disminución significativa de los niveles en plasma en los pacientes enfermos demuestra también **la asociación con la progresión, la supervivencia y el aumento de estrés oxidativo**²¹. Cabe destacar que esta deficiencia de actividad antioxidante provoca un aumento excesivo de ROS y RNS produciendo un daño celular generalizado, concorde a lo anteriormente descrito^{10,12}. Con ello se constata que **la disminución de la actividad antioxidante del urato está directamente correlacionada con el aumento de daño oxidativo producido en el organismo enfermo de ELA**.

Además, el aumento significativo **de 3-nitrotirosina y 8-hidroxiguanina** tanto en plasma como LCR en los pacientes con ELA (tanto esporádico como familiar) demuestran el rol que el daño oxidativo ejerce en la enfermedad, **considerándose así biomarcadores de estrés oxidativo**¹⁹. Es importante señalar que ambos biomarcadores **no son específicos de ELA** sino que son marcadores de estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas en general.

Por otra parte, **el ratio de %CoQ10 (porcentaje de CoQ10) y el %PUFA (porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados)** estaba alterado corroborando un incremento en los niveles de daño oxidativo en los pacientes con ELA; mientras %CoQ10 aumentaba, %PUFA disminuía¹⁹. **Al no ser biomarcadores específicos de ELA** lo conveniente sería utilizarlos conjuntamente con el objetivo de **establecer un perfil de biomarcadores característicos de ELA** tanto para diagnóstico como para indicador de estrés oxidativo.

Otro biomarcador de estrés oxidativo descrito fue el MDA (malondialdehído) que presentaba concentraciones plasmáticas importantes en comparación con el grupo sano²². El MDA es uno de los marcadores de estrés oxidativo más utilizados a nivel internacional. La contra que presenta es que **no existe un protocolo bien establecido para cuantificarlo a través de HPLC** (cromatografía líquida de alta eficacia) **y por ELISA** ha dado algunos problemas, generando su utilización cierta controversia.

Además, al ser un marcador de estrés oxidativo, **se encuentra aumentado en plasma si existe cualquier tipo de proceso oxidativo, no sólo en ELA**²².

En ese mismo estudio, junto con otro²⁰, se analizaron “productos de proteínas de oxidación avanzada” (AOPP) y la capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP) los cuales fueron considerados como biomarcadores típicos para medir el nivel de oxidación plasmático en ELA. Mientras que las concentraciones de AOPP y FRAP aumentaban, las de los tioles libres disminuían según Baillet et al.²², aunque en el estudio realizado por LoGerfo et al. se mantenían en concentraciones normales²⁰. **Por ello, la utilización de los tioles libres en plasma no sería adecuada debido a la falta de especificidad y la controversia mostrada en este apartado.**

Muchas de las características neuromotoras en ELA pueden deberse a la acumulación de metales neurotóxicos, siendo este el motivo de estudio realizado por Roos et al. **Se encontraron altas concentraciones de Mn, Al, Cd, Co, Cu, Zn, Pb, V y U en LCR de pacientes con ELA. Por otra parte, niveles ligeramente elevados de Hg y Ag fueron encontrados en plasma.** Muchos de estos metales poseen propiedades neurotóxicas por lo que el paso y acumulación de estas moléculas en la barrera hematoencefálica podrían producir las características celulares neurodegenerativas típicas de ELA²⁴. No obstante, concentraciones plasmáticas de selenio y zinc fueron significativamente menores en ELA según Baillet et al.²² demostrando una falta de cohesión entre ambos estudios que dificulta la determinación de marcadores típicos de ELA. De todas formas, pese a dichas diferencias es indiscutible la **aparición de concentraciones elevadas de metales pesados en enfermos de ELA.** Sería importante tener este punto en cuenta a la hora de realizar un seguimiento de enfermos de ELA y ver si es posible aplicar un tratamiento que disminuya los niveles de ellos y se relacione con una buena progresión.

Sobre las enzimas antioxidantes, se observó que **la actividad de la SOD1**, responsable del 20% de los casos de ELA familiar como se ha descrito anteriormente¹, es notablemente menor en los pacientes enfermos por lo que indica que esta disminución se correlaciona con la progresión de la enfermedad, demostrando el aumento de lesiones proteicas oxidativas^{22,23}.

Al igual que la SOD1, la actividad de la GPx (relacionada con el rápido progreso de la enfermedad) y GR también disminuye significativamente comparado con el grupo control²³. Sin embargo, en el estudio realizado por Baillet et al. la actividad de la GPx permanecía en rangos normales²².

Como se ha indicado en la introducción, la SOD está mutada en los casos de ELA familiar, pero no en los de esporádica^{1,4} hecho que hace que **la mutación de SOD sea un marcador de diagnóstico de ELA familiar importante.**

Por último, en la realización de un estudio sobre la enfermedad de Parkinson se observaron diversas analogías con ELA. Se demostró **que los niveles plasmáticos de 24OH-C (24-hidroxicolesterilo)** se encontraban disminuidos en los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, entre ellas ELA, pero debido a su inespecificidad solo podría utilizarse para **medir el daño oxidativo producido con la progresión de la enfermedad junto con la actividad de la enzima LCAT (lecitín-colesterol acil transferasa) que disminuye con el aumento de daño oxidativo**²⁵.

Por ello, los marcadores descritos en el presente apartado muestran la implicación del daño oxidativo en ELA además de la alteración del sistema redox, característica propia de ELA detallada anteriormente^{7,12,15}. Pero de los descritos, serían unos buenos candidatos como marcadores de estrés oxidativo el MDA, el 24OH-C y el estudio de AOPP y FRAPP para ELA esporádico, SOD en el caso de familiar y la 3-nitrotirosina y la 8-hidroxiguanina en ambos. Todos ellos junto a %CoQ10 y %PUFA podrían utilizarse formando un perfil de biomarcadores específicos de ELA.

2. Biomarcadores metabólicos

| NOMBRE DEL ARTÍCULO | AUTOR | RESULTADOS | REF. |
|--|---|--|------|
| Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and homocysteine's metabolites: Potential bio-markers of ALS | Cieslarova Z, Lopes FS, do Lago CL, França MC Jr, Colnaghi Simionato AV | -Las concentraciones de glutamato y cisteína eran significativamente mayores en los pacientes con ELA. | 26 |
| Peripheral biomarkers of excitotoxicity in neurological diseases | Tremolizzo L., Sala G., y Ferrarese C. | -Aumento relevante de los niveles de glutamato en plasma (relacionándose con la progresión de la enfermedad) y LCR en ELA. | 27 |
| Biochemical alterations associated with ALS | Lawton KA, Cudkowicz ME, Brown MV, Alexander D, Caffrey R, Wulff JE, et al. | -Esteroil esfingomielina como marcador de rotura mielínica dado los niveles alterados en ELA. -Aumento significativo de los niveles plasmáticos de L-carnitina, lisolípidos y esfingolípidos en ELA mientras que los de triptófano betaína disminuyen. | 28 |
| Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with ALS from disease mimics | Lawton KA, Brown MV, Alexander D, Li Z, Wulff JE, Lawson R, et al. | -Ciertos metabolitos plasmáticos han sido demostrados como biomarcadores diagnósticos dado su importante aumento en el grupo enfermo. -Los ácidos grasos de cadena larga, los ácidos dicarboxílicos, creatina y el palmitoil aumentan significativamente en el plasma de los pacientes con ELA mientras que el urato y creatinina disminuyen. | 29 |
| Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigoursly matched ALS, PD and control subjects | Wuolikainen A, Jonsson P, Ahnlund M, Antti H, Marklund SL, Moritz T, et al. | -Diversos metabolitos plasmáticos presentaban alteraciones importantes en los pacientes enfermos comparado con el grupo de referencia. | 30 |
| Monitoring disease progression with plasma creatinine in ALS clinical trials | van Eijk RPA, Eijkemans MJC, Ferguson TA, Nikolakopoulos S, Veldink JH, vanden Berg LH. | -Los niveles plasmáticos de creatinina disminuyen conforme la progresión de la enfermedad considerándose así, un biomarcador de progresión y supervivencia en ELA. | 31 |
| Plasma oxysterol profiling in children reveals 24-hydroxycholesterol as a potential marker for Autism Spectrum Disorders | : Grayaa S, Zerbinati C, Messedi M, Hadjkacem I, Chtourou M, Ben Touhemi D, et al. | -Potencial uso del oxysterol como biomarcador debido la alteración en las concentraciones en los pacientes con ELA. | 32 |

Tabla 6: Artículos científicos donde se ha estudiado la metabolómica como biomarcador en ELA.

Se encontraron siete estudios científicos que observaban el uso de la metabolómica para la obtención de diversos biomarcadores diagnósticos y de progresión de ELA esporádica

tanto en muestras plasmáticas como en LCR (ver tabla 5). Los diversos estudios han mostrado una gran batería de metabolitos que se podrían utilizar como biomarcadores tanto de pronóstico como progresión. No se han encontrado contradicciones en los siguientes resultados:

Un significativo aumento de glutamato y cisteína también fueron distinguidos en pacientes con ELA tanto en plasma (relacionándose con la duración de la enfermedad) como en muestra de LCR^{26,27}. Referente a lo descrito anteriormente en la introducción, se confirma el aumento del glutamato en el espacio sináptico el cual produce una excitotoxicidad capaz de dañar a la célula provocando la apoptosis^{7,9}. Pero aunque este **aumento de glutamato es indicativo de ELA, se necesitan más estudios para verificar su utilización como biomarcador diagnóstico** debido a la baja especificidad que presenta en la actualidad.

Como biomarcadores diagnósticos de la enfermedad se demostraron el 2-hidroxiacetato, α -cetoglutarato, cortisona, colesterol, 1-estearoil-GPI, octadecanedioato, araquidonato, dodecanedioato, ácidos grasos de cadena larga, ácidos dicarboxílicos, creatina, palmitoil y urato (comentado en el apartado anterior) los cuales presentaban alteraciones importantes en los niveles en las muestras en comparación con el grupo control²⁹. Aunque se hayan descrito como biomarcadores diagnósticos se necesitan de más estudios científicos que confirmen el uso de estos marcadores con una sensibilidad y especificidad adecuada para el diagnóstico precoz de la enfermedad, procedimiento indispensable para la confirmación del proceso patológico en la etapa temprana de la enfermedad, como se ha descrito con la introducción^{2,4,6}, con el objetivo de aumentar la supervivencia de las personas con ELA.

Por otra parte, en el estudio realizado por Lawton et al. se demostró el uso **del estearoil esfingomielina como biomarcador de rotura mielínica**²⁸ proceso relacionado con la pérdida de motoneuronas, característica principal de ELA ya comentada¹. Además, se ha demostrado una correlación longitudinal entre la pérdida de **creatinina** y el avance de la enfermedad, pudiendo utilizarse **como biomarcador para monitorizar la progresión de la enfermedad**³¹.

Cabe destacar que otros metabolitos plasmáticos presentan concentraciones alteradas que favorecen la diferenciación de los pacientes con ELA del grupo control. Niveles aumentados de creatina, L-carnitina, lisolipidos, esfingolipidos, prolina y monofosfato de adenosina se estudiaron en plasma mientras que se encontraron disminuidos la creatinina, triptófano betaina, ácido ribónico, la prostaglandina A2, ácido homovanílico, hipoxantina y cisteamina^{28,30}. Cabe destacar **que estos metabolitos no presentan una alteración relevante por lo que no ayudarían al diagnóstico o seguimiento de estos pacientes** pero si se instauraran conjuntamente en un perfil de biomarcadores podrían respaldar la diagnosis de ELA.

Por último, a través de un estudio sobre el trastorno del espectro autista se observó las analogías de esta enfermedad con ELA. Por ello, se demostró que había una alteración en el metabolismo del **colesterol generando un efecto neurotóxico a las células**³²,

característica imprescindible en la enfermedad de ELA **aunque no queda demostrada su utilidad como biomarcador.**

Algunos de los estudios anteriores, al ser de tipo transversal, solo nos indican el aumento de determinados metabolitos en plasma pero no sabemos cómo podría variar en el tiempo haciendo necesario la realización de más estudios para verificar su utilización como biomarcador cuando realizamos una intervención en los enfermos de ELA.

En resumen, dentro de la metabolómica se encuentran como biomarcadores diagnósticos el 2-hidroxiacetato, α -cetoglutarato, cortisona, colesterol, 1-estearoil-GPI, octadecanedioato, araquidonato, dodecanedioato, ácidos grasos de cadena larga, ácidos dicarboxílicos, creatina, palmitoil y urato. Además, el uso del glutamato como biomarcador podría ser indicativo de ELA aunque se necesitan estudios más ampliados. Por otra parte, el uso de la creatinina como biomarcador de progresión queda demostrado.

Estos resultados nos vuelven a indicar la necesidad de realizar **un perfil de biomarcadores** para cualquiera de los casos de ELA.

3. Cistatina C como biomarcador

| NOMBRE DEL ARTÍCULO | AUTOR | RESULTADOS | REF. |
|--|--|--|------|
| Cystatin C: a candidate biomarker for ALS | Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, Bowser R. | -Cistatina C como biomarcador diagnóstico en ELA por su significativa reducción en LCR y aumento en plasma. -Cistatina C como biomarcador pronóstico y de progresión: a menor concentración de cistatina C en LCR, menor supervivencia. | 33 |
| Protein biomarkers for ALS: characterization and implications for disease pathogenesis | Wilson ME | -Aumento significativo de cistatina C en plasma en comparación con la disminución en muestra de LCR. -Los cambios longitudinales de cistatina C en LCR demuestra su potente utilización como biomarcador de progresión y pronóstico. | 34 |

Tabla 7: Artículos científicos donde se han estudiado el potencial uso de la cistatina C como biomarcador en ELA.

Dos artículos sobre el potencial uso de la cistatina C fueron encontrados en la búsqueda realizada (ver tabla 7), llegando a las siguientes conclusiones:

En ambos estudios realizados se encontraron diversas analogías como la disminución de los niveles de esta proteína en LCR en comparación con el grupo control. Sin embargo, la concentración plasmática de la cistatina C aumentaba en los pacientes con ELA^{33,34}. La variación de los resultados en ambas muestras demuestra una capacidad limitada de diagnóstico pero sí podría mejorar los parámetros diagnósticos de la enfermedad si se utilizase junto con un perfil de biomarcadores definidos como específicos de ELA.

Además, **la disminución de los niveles de cistatina C a lo largo del tiempo, indicaría la utilidad de esta proteína como biomarcador de progresión.** Asimismo, **se demostró la utilidad de la cistatina C en LCR como biomarcador de pronóstico y de supervivencia;** a mayor concentración en LCR de cistatina C mayor supervivencia^{33,34}.

La cistatina C tiene propiedades tanto neurotóxicas como neuroprotectoras por lo que el adecuado equilibrio en las concentraciones mantienen un funcionamiento fisiológico idóneo. Cabe destacar, que la cistatina C elevada en LCR aparece en condiciones inflamatorias mostrando así relación con la neuroinflamación, mecanismo patológico característico de ELA ya mostrado en la introducción^{9,14}. **Sin embargo, la utilización de la cistatina C como parámetro diagnóstico necesitaría ser más analizado debido a la presencia de neuroinflamación en otras enfermedades neurodegenerativas y no solamente en ELA.**

4. TDP-43 como biomarcador

| NOMBRE DEL ARTÍCULO | AUTOR | RESULTADOS | REF. |
|--|---|--|------|
| TDP-43 plasma levels are higher in ALS | Verstraete E, Kuiperij HB, van Blitterswijk MM, Veldink JH, Schelhaas HJ, van den Berg LH, et al. | -Niveles plasmáticos aumentados de TDP-43 en enfermos de ELA, correlacionándose positivamente con la edad. | 35 |
| Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with ALS | Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. | -Las concentraciones de TDP-43 en LCR fueron mayores en los pacientes con ELA comparado con el grupo control. -Los niveles de TDP-43 aumentan en estadios tempranos de la enfermedad. | 36 |

Tabla 8: Artículos científicos donde se han estudiado la posibilidad de TDP-43 como biomarcador en ELA.

Se han encontrados dos estudios que investigan la proteína TDP-43 (que es codificada por el gen TARDBP) como posible biomarcador tanto de ELA esporádico como familiar (ver tabla 8). En ambos estudios se llegan a las siguientes conclusiones:

Tanto un grupo como el otro demostraron que los niveles de TDP-43 en los pacientes con ELA fueron significativamente mayores respecto al grupo control, a pesar de la diferencia de la muestra (Verstraete et al. realiza el estudio en plasma mientras que el otro estudio es en LCR)^{35,36}.

Como se ha mostrado en la introducción, alrededor del 5% de los casos de ELA familiar presentan una mutación del gen, por tanto, **la proteína codificada TDP-43 sí podría servir como un buen biomarcador diagnóstico para ELA familiar**^{1,3,4}. Pero como indica Verstraete et al., en estudios longitudinales, no hay variación de TDP-43 en el tiempo en enfermos de ELA³⁵. Además, según Kasai et al. hay una disminución de los niveles de TDP-43 conforme disminuyen el número de motoneuronas en la medula espinal³⁶; por

ello **no sería un buen marcador en estudios de intervención donde quisiéramos valorar si nuestro tratamiento provoca mejorías en el enfermo**³⁶.

En resumen, **el uso del biomarcador TDP-43 en la etapa inicial de la enfermedad podría ayudar al diagnóstico tanto de ELA esporádico como familiar** aunque se debería ampliar el estudio debido a las diferencias encontradas entre ambas investigaciones.

5. Otros biomarcadores

Por último, otras investigaciones se han realizado con el objetivo de hallar nuevos marcadores para ELA (ver tabla 9).

Varios han sido los estudios que hablan sobre el factor de crecimiento VEGF aunque hay controversia entre los distintos resultados. Carilho et al. observó la existencia de niveles altos de VEGF en plasma y niveles bajo en muestras de LCR comparado con el grupo control. Además, factores externos como el comienzo de la ventilación mecánica pueden modular la expresión de VEGF³⁷. Sin embargo, en el estudio realizado por Mitchell RM se observó un aumento significativo de los niveles de VEGF (en la muestra de LCR) con el avance de la enfermedad comparado con el grupo control, demostrando controversia con los resultados anteriores³⁹. Tras las diferencias mostradas, **queda descartado el uso del VEGF como biomarcador de progresión**.

De igual modo, **MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) también son considerados como biomarcadores de progresión** dado que en varios estudios se demuestra que con el progreso de la enfermedad hay un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MCP-1 mientras que los de GM-CSF disminuyen³⁸⁻⁴⁰. Cabe señalar que la alteración de la MCP-1 ya fue indicada anteriormente en la introducción⁶, **por lo que su utilización como biomarcador queda demostrada tras observar la alteración producida en los enfermos de ELA**.

En estos mismos estudios también se manifiesta que los niveles de L-ferritina y transferrina están alterados frente al grupo de referencia. **Mientras que L-ferritina aumenta significativamente, los niveles plasmáticos de transferrina disminuyen considerándose así biomarcadores diagnósticos**³⁸⁻⁴⁰.

Por otra parte varios estudios analizaron las concentraciones de PCR, un importante marcador inflamatorio del organismo. En varios trabajos se observaron que no había una diferencia importante en las concentraciones de PCR en LCR entre el grupo control y los pacientes enfermos^{38,39,43}. Sin embargo, en el estudio realizado por Lunetta C et al. **se demuestra el uso de la PCR (proteína C reactiva) como biomarcador pronóstico en ELA** debido a la correlación directa existente entre el aumento significativo de los valores en LCR y la reducción de la supervivencia⁴¹. Basándonos en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad descritos con anterioridad⁶, el uso de esta proteína inflamatoria sí podría utilizarse en ELA ya que la neuroinflamación es un mecanismo inherente a la enfermedad.

| NOMBRE DEL ARTÍCULO | AUTOR | RESULTADOS | REF. |
|---|---|--|------|
| Vascular endothelial growth factor and ALS: the interplay with exercise and noninvasive ventilation | Carilho R, de Carvalho M, Swash M, Pinto S, Pinto A, Costa J. | -Los pacientes en fase avanzada y con ventilación no invasiva presentaban aumento de VEGF en ambas muestras. | 37 |
| Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship with iron homeostasis | Mitchell RM, Simmons Z, Beard JL, Stephens HE, Connor JR. | -Sugieren que podrían ser biomarcadores de progresión tanto MCP-1 como GM-CSF en plasma. -L-ferritina y transferrina como biomarcadores diagnósticos. | 38 |
| Contribution of HFE polymorphisms to pathogenetic mechanisms of ALS | Mitchell RM | -Citoquinas inflamatorias en plasma alteradas en ELA. -L-ferritina y transferrina asociados con el diagnóstico de ELA. -MCP-1 y GM-CSF en plasma como biomarcadores de progresión. | 39 |
| Investigating the interplay of intrinsic to extrinsic factors influencing ALS disease progression | Su XM | -Perfil de biomarcadores predictivos en ELA compuesto por diversas citoquinas inflamatorias en plasma. -L-ferritina asociada al diagnóstico y la progresión de ELA tras los niveles alterados en plasma. | 40 |
| Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in ALS | Lunetta C, Lizio A, Maestri E, Sansone VA, Mora G, Miller RG, et al. | -Potencial uso de la proteína C reactiva (PCR) como biomarcador de pronóstico en los enfermos de ELA. | 41 |
| Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in ALS | Pronto-Laborinho AC, Gromicho M, Pereira M, Pinto S, Barros MDA, Swash M, et al. | -Significativo aumento de los niveles en plasma de CC-16 demostrando ser un biomarcador de fallo respiratorio inminente y de progresión de la enfermedad. | 42 |
| Combination of neurofilament heavy chain and complement c3 as CSF biomarkers for ALS | Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R. | -Los niveles en LCR de la cadena fosforilada de neurofilamento fosforilado (pNFH) y el complemento C3 como biomarcador pronóstico en ELA. | 43 |
| Pathophysiological implications of actin-free-Gc-globulin concentration changes in blood plasma and CSF collected from patients with Alzheimer's disease and other neurological disorders | Kuřakowska A, Tarasiuk J, Kapica-Topczewska K, Chorąży M, Pogorzelski R, Kulczyńska-Przybik A, et al. | -La concentración de globulina Gc libre en el suero de pacientes con ELA es significativamente mayor que el grupo de referencia, pudiendo ser utilizado como biomarcador diagnóstico en la etapa inicial de la enfermedad. | 44 |
| Evaluation of chitotriosidase and CC-Chemokine ligand 18 as biomarkers of microglia activation in ALS | Martinez-Merino L, Iridoy M, Galbete A, Roldán M, Rivero A, Acha B, et al. | -Importante aumento de la actividad de la quitotriosidasa (ChT) y TNF α en muestras de LCR, por lo que son posibles biomarcadores de ELA esporádico. | 45 |
| Blood lead, bone turnover and survival in ALS | Fang F, Peters TL, Beard JD, Umbach DM, Keller J, Mariosa D, et al. | -Las muestras plasmáticas de plomo, CTX y PINP como biomarcadores pronósticos. | 46 |
| TLQP peptides in ALS: possible blood biomarkers with a neuroprotective role | Brancia C, Noli B, Boido M, Pilleri R, Boi A, Puddu R, et al. | -Péptidos TLQP como biomarcadores diagnósticos y de progresión de ELA. | 47 |
| A multi-matrix HILIC-MS/MS method for the quantitation of endogenous small molecule neurological biomarker N-acetyl aspartic acid (NAA) | Sangaraju D, Shahidi-Latham SK, Burgess BL, Dean B, Ding X. | -Los niveles de ácido N-acetil aspártico (NAA) en muestra LCR son relativamente más bajos que en el grupo control, mientras que en muestra plasmática no se encontraron diferencias. | 48 |
| ALS: a novel rare cause of elevated plasma troponin T levels | Von Lueder TG., Melsom MN., Atar D., Agewall S. | -En hasta el 50% de pacientes con ELA se han reportado niveles elevados de CK. | 49 |

Tabla 9: Artículos científicos donde se han estudiado posibles biomarcadores en ELA.

Los biomarcadores plasmáticos predictivos que diferían significativamente entre pacientes y grupo control por su respectivo aumento eran: MCP-1, GM-CSF, G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y diversas citoquinas inflamatorias como la IL-8, IL-10 e IL-12. **Niveles de IL-8, G-CSF, IL-10 indicaban mayor supervivencia mientras que los de MCP-1 e IL-12 eran indicativos de una duración menor**^{39,40}.

Otro marcador característico demostrado es el **CC-16 (proteína de las células clara), un biomarcador de disfunción pulmonar significativamente aumentado en el plasma del grupo con ELA**. Además, la alteración en los niveles mostraba una mayor progresión de la enfermedad junto con la necesidad de ventilación mecánica no invasiva dentro de los 6 meses posteriores, incrementando así el riesgo de muerte. Por ello, **es considerado un marcador de progresión en la enfermedad**⁴². Asimismo, la **pNFH (cadena pesada de neurofilamento fosforilado) y el complemento C3 también fueron considerados como biomarcadores pronósticos** por su aumento significativo en los pacientes enfermos de ELA⁴³.

Por otro lado, la cuantificación de los niveles **de globulina Gc libre en LCR podría servir para el diagnóstico precoz de la enfermedad** dado que el significativo aumento en los pacientes con ELA en la etapa inicial de la enfermedad es característico⁴⁴.

Como biomarcadores diagnósticos de ELA esporádico también se encontraron la ChT (quitotriosidasa) y TNF α en muestras de LCR por su importante aumento en la actividad⁴⁵. Cabe destacar que el aumento de la enzima ChT podría entenderse como un proceso neuroinflamatorio el cual incrementa en la fase temprana de la edad, como se ha demostrado en los puntos descritos anteriormente^{9,14}. En referencia al aumento de TNF α queda demostrado su uso como biomarcador diagnóstico ya que, como se había dicho en la introducción, durante la activación de la microglía se liberaban altas dosis de TNF α , moléculas citotóxicas generadas durante la neuroinflamación^{14,18}.

Las muestras plasmáticas de plomo, CTX (telopéptido C-terminal del colágeno tipo I) y PINP (propéptido N-terminal del protocógeno tipo I) fueron mayores en ELA comparado con el grupo control demostrando una correlación inversa con la supervivencia, por lo que se podrían utilizar como marcadores de progresión. Además, la exposición a **plomo** también se asoció a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad por lo que **podría utilizarse como marcador pronóstico en ELA esporádico**⁴⁶.

La utilización de los **péptidos TLQP podrían ser indicadores para el diagnóstico precoz de ELA esporádico** por su pronta respuesta ante el estrés oxidativo. Asimismo, el descenso significativo de los niveles plasmáticos acorde al progreso de la enfermedad sería indicativo de considerarse como un biomarcador de progresión. Por ello, **su uso como biomarcador diagnóstico y de progresión quedaría demostrado** aunque se deberían realizar más análisis sobre su utilización como tal con el propósito de un diagnóstico precoz de la enfermedad conjuntamente con un tratamiento farmacológico eficaz⁴⁷. Además, **el NAA (ácido N-acetil aspártico), marcador indicativo de la actividad metabólica neuronal, podría utilizarse en ELA esporádico como biomarcador asociado**

a la **pérdida de función neuronal**, característica ya vista en la introducción¹ causante de la sintomatología de la enfermedad⁴⁸.

Por último, en el caso del estudio realizado por Vonlueder et al. se observó que más de la mitad de los pacientes con ELA tenían niveles elevados de CK (creatina quinasa) en plasma sanguíneo además del aumento de troponina T dando indicios de daño muscular o fatiga. **La utilización de CK como marcador genera controversia** ya que es verdad que en ELA se produce una distrofia muscular, demostrada anteriormente en la introducción¹, pero los niveles elevados de CK también pueden aparecer elevados en procesos miocárdicos o debido a la toma de ciertos medicamentos **por lo que uso como biomarcador en ELA queda descartado**⁴⁹.

Por todo lo comentado, como biomarcador diagnóstico de ELA esporádico se indican la L-ferritina, transferrina, ChT, TNF α , péptidos TLQP, globulina Gc libre y NAA. Por otro lado, son considerados como biomarcadores tanto de pronóstico como de progresión la CC-16, MCP-1, GM-CSF, PCR, plomo, pNFH, el complemento C3 y ciertas citoquinas inflamatorias como la IL-8, IL-10 e IL-12. Además, el uso del factor de crecimiento VEGF como biomarcador de progresión también ha sido propuesto aunque se necesitan más estudios debido a la falta de evidencias respecto al tema.

Como se ha visto, la revisión bibliográfica presente demuestra que realmente **sí existen biomarcadores moleculares potenciales tanto de diagnóstico como de progresión para la enfermedad de ELA**. Aunque los resultados obtenidos son muy positivos, el conjunto de estudios encontrados en la realización de la búsqueda bibliográfica demuestra la falta de homogeneidad entre los resultados obtenidos, es decir, cada estudio realiza una búsqueda sobre proteínas o moléculas diversas sin llegar a un perfil de biomarcadores claro. Dicha falta de homogeneidad genera en sí una limitación en el análisis realizado.

Como perspectiva de futuro sería interesante ampliar el estudio sobre biomarcadores moleculares diagnósticos y de progresión para el diagnóstico precoz y el seguimiento de los pacientes con ELA. Asimismo se deberían de realizar estudios interdisciplinarios ya que ELA es una enfermedad muy compleja y no solamente es necesario la toma de diversos biomarcadores moleculares tanto de pronóstico como de seguimiento sino que también sería conveniente la toma de marcadores propios de otras disciplinas como la nutrición y la fisioterapia entre otras especialidades.

Tras el análisis exhaustivo realizado en el presente trabajo los marcadores más factibles que podrían utilizarse en un posible perfil de biomarcadores específico de ELA serían los siguientes:

En ELA familiar utilizaría SOD y TDP-43 como biomarcadores diagnósticos puesto que gran número de los enfermos en esta variable de ELA son debido a las mutaciones genéticas producidas en estas moléculas, a parte de la evidencia científica mostrada en los anteriores estudios.

En ELA esporádico hay más variedad de marcadores dado que el porcentaje de enfermos es mayor que en tipo familiar y por .tanto, más estudios han sido realizados para tal propósito.

Como biomarcadores diagnósticos incorporaría el glutamato, cisteína, creatina, urato, L-ferritina, transferrina, ChT, TNF α y los péptidos TLQP (también sirven para monitorizar la progresión).

La creatinina, PCR, cistatina C, MCP-1, GM-CSF, G-CSF, CC-16, pNFH, complemento C3, plomo, CTX, PINP, IL-8, IL-10 e IL-12 serían los marcadores para evaluar la progresión de la enfermedad, además de proporcionarnos un pronóstico aproximado de supervivencia.

Esta sería una idea general sobre cómo se conformaría un posible panel de marcadores en ELA. Cabe decir que otras muchas moléculas han sido estudiadas con el fin de demostrar su interés en un perfil de biomarcadores específico de ELA para apoyar la diagnosis y el seguimiento de la enfermedad aunque, a día de hoy, hacen falta más investigaciones que aporten información a dicho estudio para poder ser estandarizados para uso clínico.

CONCLUSIONES

- Todos los estudios realizados analizan marcadores de fácil análisis los cuales han sido obtenidos a través del plasma sanguíneo (pero no todos ellos han sido específicos de ELA).
- En ELA esporádico se conforma un perfil de biomarcadores específico en el que se incorporan para el diagnóstico el glutamato, creatina, urato, L-ferritina, transferrina, ChT, TNF α y péptidos TLQP. Además, la PCR, cistatina C, MCP-1, GM-CSF, creatinina, urato y ciertas citoquinas inflamatorias son los biomarcadores de progresión en la enfermedad. Actualmente, se le da mucha importancia a la PCR como biomarcador.
- En ELA familiar queda demostrada la presencia de mutaciones genéticas en SOD y TDP-43 en la enfermedad por lo que su uso como biomarcadores para el diagnóstico queda verificado. En el caso del seguimiento de la enfermedad ante una intervención, podrían utilizarse los marcadores descritos en ELA esporádico.
- Es necesario contemplar un panel específico de biomarcadores moleculares en ELA no solamente para el diagnóstico precoz sino para el seguimiento de la enfermedad en el estudio de tratamiento de ELA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*. 2015; 7:181-93.
- 2 Salameh JS, Brown RH Jr, Berry JD. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. *Semin Neurol*. 2015; 35:469-76.
- 3 Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011; 377:942-55.
- 4 Ajroud-Driss S, Siddique T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852:679-84.
- 5 Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2009; 65:S3-9.
- 6 Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, et al. Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013; 14:19-32.
- 7 Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48:629-41.
- 8 Carri MT, Valle C, Bozzo F, Cozzolino M. Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 [citado 21 Nov 2018]; 9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4330888/>
- 9 Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76:1046-57.
- 10 Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016; 53:4094-125.
- 11 Yuan S, Zhang ZW, Li ZL. Cell Death-Autophagy Loop and Glutamate-Glutamine Cycle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2017 [citado 21 Nov 2018]; 10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5519524/>
- 12 Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*. 2015; 74:101-10.
- 13 He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 44:532-53.

- 14 Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [citado 22 Nov 2018]; 8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5567007/>
- 15 Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017; 39:73-82.
- 16 Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7:65-74.
- 17 Lall D, Baloh RH. Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *J Clin Invest.* 2017; 127:3250-8.
- 18 Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci.* 2015; 77:537-49.
- 19 Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. *Redox Rep.* 2016; 21:104-12.
- 20 LoGerfo A, Chico L, Borgia L, Petrozzi L, Rocchi A, D'Amelio A, et al. Lack of association between nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 promoter gene polymorphisms and oxidative stress biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014 [citado 9 Feb 2019];432626. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941162/>
- 21 O'Reilly ÉJ, Bjornevik K, Schwarzschild MA, McCullough ML, Kolonel LN, Le Marchand L, et al. Pre-diagnostic plasma urate and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2018; 19:194-200.
- 22 Baillet A, Chantepedrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010; 35:1530-7.
- 23 Cova E, Bongioanni P, Cereda C, Metelli MR, Salvaneschi L, Bernuzzi S, et al. Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurochem Int.* 2010; 56:687-93.
- 24 Roos PM, Vesterberg O, Syversen T, Flaten TP, Nordberg M. Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 151:159-70.
- 25 Di Natale C, Monaco A, Pedone C, Tessitore A, De Mase A, Tedeschi G, et al. The level of 24-hydroxycholesteryl esters decreases in plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2018; 672:108-12.
- 26 Cieslarova Z, Lopes FS, do Lago CL, França MC Jr, Colnaghi Simionato AV. Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and

homocysteine's metabolites: Potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis. *Talanta*. 2017; 170:63-8.

27 Tremolizzo L, Sala G, Ferrarese C. Peripheral biomarkers of excitotoxicity in neurological diseases. In: Ritsner MS, editor. *The handbook of neuropsychiatric biomarkers, Endophenotypes and Genes*. Vol 3: Metabolic and peripheral biomarkers. New York, NY: Springer Science + Business Media; 2009. p. 85–106.

28 Lawton KA, Cudkowicz ME, Brown MV, Alexander D, Caffrey R, Wulff JE, et al. Biochemical alterations associated with ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012; 13:110-8.

29 Lawton KA, Brown MV, Alexander D, Li Z, Wulff JE, Lawson R, et al. Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014; 15:362-70.

30 Wuolikainen A, Jonsson P, Ahnlund M, Antti H, Marklund SL, Moritz T, et al. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Mol Biosyst*. 2016; 12:1287-98.

31 van Eijk RPA, Eijkemans MJC, Ferguson TA, Nikolakopoulos S, Veldink JH, vanden Berg LH. Monitoring disease progression with plasma creatinine in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018; 89:156-61.

32 Grayaa S, Zerbinati C, Messedi M, Hadjkacem I, Chtourou M, Ben Touhemi D, et al. Plasma oxysterol profiling in children reveals 24-hydroxycholesterol as a potential marker for Autism Spectrum Disorders. *Biochimie*. 2018; 153:80-5.

33 Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, Bowser R. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2010 [citado 9 Feb 2019]; 5:15133. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000338/>

34 Wilson ME. Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Charaterization and implications for disease pathogenesis [dissertation]. University of Pittsburgh; 2012.

35 Verstraete E, Kuiperij HB, van Blitterswijk MM, Veldink JH, Schelhaas HJ, van den Berg LH, et al. TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012; 13:446-51.

36 Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, et al. Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*. 2009; 117:55–62.

37 Carilho R, de Carvalho M, Swash M, Pinto S, Pinto A, Costa J. Vascular endothelial growth factor and amyotrophic lateral sclerosis: the interplay with exercise and noninvasive ventilation. *Muscle Nerve*. 2014; 49:545-50.

38 Mitchell RM, Simmons Z, Beard JL, Stephens HE, Connor JR. Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis. *Muscle Nerve*. 2010; 42:95-103.

- 39 Mitchell RM. Contribution of hfe polymorphisms to pathogenetic mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis [dissertation]. The Pennsylvania State University; 2010.
- 40 Su XW. Investigating the interplay of intrinsic to extrinsic factors influencing amyotrophic lateral sclerosis disease progression [dissertation]. The Pennsylvania State University; 2014.
- 41 Lunetta C, Lizio A, Maestri E, Sansone VA, Mora G, Miller RG, et al. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2017; 74:660-7.
- 42 Pronto-Laborinho AC, Gromicho M, Pereira M, Pinto S, Barros MDA, Swash M, et al. Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2018; 137:233-7.
- 43 Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R. Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem.* 2011; 117:528-37.
- 44 Kułakowska A, Tarasiuk J, Kapica-Topczewska K, Chorąży M, Pogorzelski R, Kulczyńska-Przybik A, et al. Pathophysiological implications of actin-free Gc-globulin concentration changes in blood plasma and cerebrospinal fluid collected from patients with Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27:1075-80.
- 45 Martinez-Merino L, Iridoy M, Galbete A, Roldán M, Rivero A, Acha B, et al. Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2018; 18:208-15.
- 46 Fang F, Peters TL, Beard JD, Umbach DM, Keller J, Mariosa D, et al. Blood Lead, Bone Turnover, and Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2017; 186:1057-64.
- 47 Brancia C, Noli B, Boido M, Pilleri R, Boi A, Puddu R, et al. TLQP Peptides in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Possible Blood Biomarkers with a Neuroprotective Role. *Neuroscience.* 2018; 380:152-63.
- 48 Sangaraju D, Shahidi-Latham SK, Burgess BL, Dean B, Ding X. A multi-matrix HILIC-MS/MS method for the quantitation of endogenous small molecule neurological biomarker N-acetyl aspartic acid (NAA). *J Pharm Biomed Anal.* 2017; 140:11-19.
- 49 Von Lueder TG, Melsom MN, Atar D, Agewall S. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a novel rare cause of elevated plasma troponin T levels. *Clin Lab.* 2011; 57:615-8.